



化学 酵素のワンポット配糖化プロセスの開発

著者	黄 偉峻
号	57
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	工博第4705号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62045

	こう い しゅん
氏 名	黄 偉 峻
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成24年9月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) バイオ工学専攻
学 位 論 文 題 目	化学-酵素的ワンポット配糖化プロセスの開発
指 導 教 員	東北大学教授 正田 晋一郎
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 中山 亨 東北大学教授 大井 秀一

論文内容要旨

第1章 序論: 糖鎖は、自然界、生体内に様々な形で存在し、生命現象等に深く関っていることから、合成化学による構造明確な糖鎖供給が求められている。有機合成とバイオ技術を組み合わせて用いる化学-酵素合成法による糖鎖合成は、その有用な手法の一つである。化学-酵素合成法の一つに、糖オキサゾリン誘導体をドナーとする糖加水分解酵素による糖転移反応を利用する方法がある。従来、糖オキサゾリン誘導体の合成は数ステップを要する有機化学合成法によって行われていたが、最近、水中かつ一段階で合成する方法が見出された。この方法は分岐オリゴ糖や酸性オリゴ糖にも適応可能であることが明らかになり、糖オキサゾリン誘導体を用いる加水分解酵素による糖転移反応は劇的な進歩を遂げた。しかしながら、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド (DMC)を用いる糖オキサゾリン化反応は、DMCの加水分解物であるDMIや用いた有機塩基の除去が困難であるために、その回収は容易ではなく、また、それらの酵素に対する影響も大きい問題点がある。そこで、本研究では、この問題を解決するにあたり、DMCによる糖オキサゾリン誘導体化反応溶液中の副生成物の除去プロセス、及びオキサゾリン化反応に用いる塩基およびDMCに替わる水溶性脱水縮合剤の検討を行った。次にこれらの知見に基づいて、糖質加水分解酵素であるヒアルロニダーゼと lacto-*N*-biosidase による効率的なワンポット配糖化プロセスの開発についてまとめた。以下、各章の概要を示す。

第2章 化学-酵素法によるヒアルロン酸(HA)のワンポット合成: 本章では、糖ドナーである糖オキサゾリン誘導体合成と、ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸合成反応のワンポット反応化について検討した。HA2糖のオキサゾリン化反応条件を検討したところ、DMCはHA2糖に対して少なくとも8当量が必要であることが明らかになった。他のアセトアミド糖と比べてDMC量がより多く必要なのは、カルボキシ基の存在があると考えられる。

ヒアルロン酸 (HA)のワンポット合成 :次に、オキサゾリン化反応生成物がヒアルロニダーゼ(HAase)に与える影響について検討した(Figure 1, Route A)。pHの影響を合わせて検討するために、糖オキサゾリン化反応溶液のpHをトリエチルアミンの添加によって調整した(pH 2~9)。反応生成物のHPLC分析を行ったところ、pHが6~9の

範囲で生成物が確認された。しかし、最大でも反応収率が 5%程度と極めて低く、オキサゾリン化反応の副生成物である DMI(約 400 mM)やトリエチルアミン塩酸塩(約 800 mM)の存在は酵素活性の保持に大きな影響を与えることが明らかになった。これらは、DMI やトリエチルアミン塩酸塩の個別の添加実験によっても同様の結果が得られたことから、酵素活性への影響を低減できうる DMC 以外の脱水縮合剤及び他の塩基の適用について検討した。

オキサゾリン化反応における塩基の検討; 固体塩基: 陰イオン交換樹脂を塩基としてオキサゾリン化反応を試みた。しかし、HA2 糖が樹脂に吸着されることが分かった。そこで、NaOH を加えて HA2 糖を樹脂からの脱離を試みたが、樹脂から脱離させることはできなかった。有機塩基除去プロセス (Figure 1, Root B): さらに有機塩基を検討した結果、ジメチルエチルアミン(DMEA)を用いて HA2 糖を定量的にオキサゾリン化することができ、また、DMEA の低沸点という特徴を利用することで塩基を反応系から除去するプロセスを開発した。すなわち、HA2 糖を DMC と DMEA によってオキサゾリン化し、次に NaOH を添加して攪拌しながら減圧することで DMEA を除去した後、HPLC を用いて DMI からを分離した。

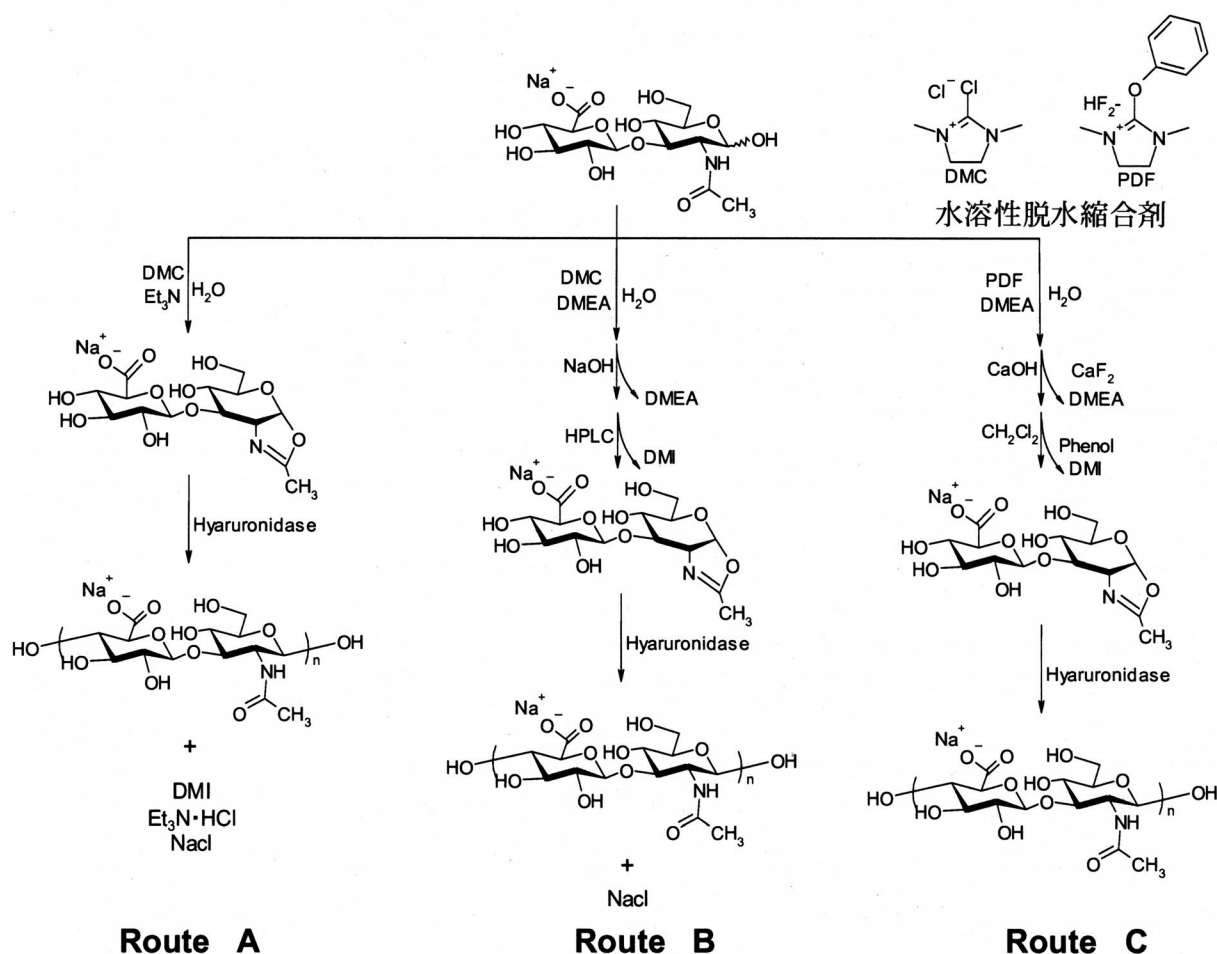


Figure 1 Chemo-enzymatic synthesis routes of hyaluronic acid. (Route A yield=4.8%, Route B yield=6.2%, Route C yield=20%, reaction time=24 hr, 37 °C, HA-oxa=50 mM, HAase=2 mg/ml)

その後、酵素を加えて糖転移反応を行ったが、反応 24 hr の HA 収率は低かった(6.2%)。さらに、HA2 糖オキサゾ

リン誘導体を GPC カラムで単離を行い、単離した HA2 糖を用いて NaCl が酵素の糖転移反応に与える影響を調べた。その結果、0.8 M 以上の高濃度の NaCl が糖転移反応溶液中に存在することで糖ドナーである HA2 糖-oxa と酵素との親和性が低下することがわかった。

PDF 脱水縮合剤を用いる HA ワンポット合成 (Figure 1, Root C): 次に塩化物を含まない水溶性脱水縮合剤である 2-フェノキシ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムハイドロジェンジフルオリド(PDF)を用いて HA2 糖オキサゾリン化を試みた。さらに Figure 1 Route C のようなプロセスで糖転移反応を行った結果、反応収率は 20% であった。このように PDF によってオキサゾリン化したヒアルロン酸 2 糖を精製処理することなしに、HAase 触媒によって HA 伸長反応を行うことが可能になった。

第3章 化学酵素法による lacto-*N*-tetraose (LNT) のワンポット合成:

Lacto-*N*-biosidase (LNBase) による糖転移反応条件検討: LNB を DMC(8 eq.) と Et₃N(24 eq.) によりオキサゾリン化した後、HPLC を用いて単離を行い、収率 76% でオキサゾリン誘導体を得た。単離した LNB-oxa を用いて LNBase による lactose (Lac) への糖転移反応条件について変異型酵素の使用、反応 pH や温度などを検討したところ、変異型酵素である Y427F を用いて、低温(4 °C)かつ高 pH(pH 10.0)で反応を行った場合、最も高い収率で糖転移生成物が得られた(Table 1 Entry 1, yield=65 %).

LNT のワンポット合成: LNB

(0.025 mmol) を DMC(8 eq.) と Et₃N(24 eq.) によって水中で(0.5 ml) オキサゾリン化し、糖オキサゾリンを精製することなしに Lactose(10 eq.) と Y427F(1 mg) の水溶液(1 ml) を加えて 4 °C で糖転移反応を行った。その結果、

反応速度の若干の低下は見られたものの、LNT の収率が約 60% と、精製して行った時とほぼ同

程度であった(Table 1, Entry 2)。次に、塩基の影響で反応速度が低下したものと考え、Figure 1 の Root B と同様な操作により反応溶液中の塩基を除去し、糖転移反応を試みたところ、予想通り、糖転移反応速度が大きくなった(Table 1, Entry 3)。従って、塩基は酵素反応の阻害剤として働いていたと言える。また DMI と NaCl は LNBase の酵素活性に対する影響が小さいことが分かった。さらに反応スケールを 100 倍に拡大して LNT のワンポット合成を試みた。その結果、LNT の収率は小スケールの場合とほぼ同程度であった(Entry 4, LNT Yield=60%)。

無機塩基(Na₃PO₄)を用いる LNT ワンポット合成の試み: これまでのワンポット糖転移反応では、低沸点の有機塩

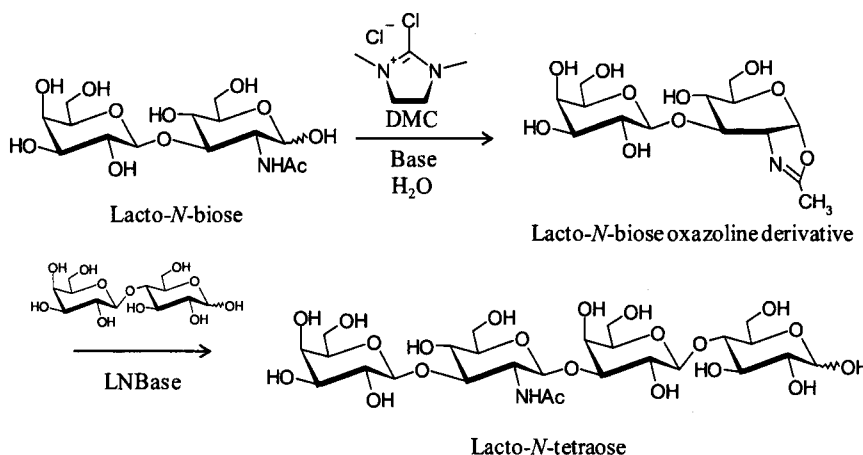


Figure 2 One-pot chemo-enzymatic synthesis of LNT

基を揮発することが必要である。LNT ワンポット合成の全反応時間を短縮するため、LNB オキサゾリン化反応に用いる塩基を無機塩基であるリン酸三ナトリウム(Na_3PO_4)に変更して試みた。反応 1.5 hr 後の LNT 収率は 70 %であった(Table 1, Entry 5)。 Na_3PO_4 は LNBase の糖転移反応活性に影響が小さいことが分かった。

Table 1 糖転移反応条件

Entry	Base (eq.)	Lactose (eq.)	NaOH (eq.)	pH	Enzyme(mg)	Time (hr)	Yield (%)
1 ^{a)}	none	10	0	10	0.1	3	65
2 ^{b)}	Et_3N (24)	10	0	10.5	0.1	48	60
3 ^{b)}	DMEA (24)	10	20	10.6	0.1	4	59
4 ^{c)}	DMEA (24)	10	18	9.6	0.6	72	60
5 ^{b)}	Na_3PO_4 (22)	20	0	10.4	0.1	1.5	70

LNB=0.025 mmol, DMC=8 eq., H_2O =1 ml, a) Purified LNB-oxa(0.025 mmol) and Glycine-Na buffer (pH 10.0, 50mM, 1ml) used. b) One-pot reaction. c) LNB=2.5 mmol, H_2O =100 ml.

第4章 総括: 本研究において、これまで実現困難と考えられてきた化学酵素法による糖鎖のワンポット合成が実現した。また、様々な反応条件を検討したことによって、高い効率配糖化プロセスを達成した。第2章では塩基除去プロセスと PDF 脱水縮合剤の使用によりヒアルロニダーゼ触媒によるヒアルロン酸の効率的なワンポット合成を実現した。第3章では、塩基除去プロセスまたは無機塩基の使用により、大量かつ効率的な LNT の化学-酵素的ワンポット合成に成功した。今後、これらの方法を利用した糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応の更なる応用と発展が期待される。

論文審査結果の要旨

糖鎖は、自然界、生体内に様々な形で存在し、材料形成、生命現象等に深く関わっていることから、合成化学による構造明確な糖鎖の供給が強く求められている。有機合成とバイオ技術を組み合わせた化学-酵素合成法は、糖鎖を効率よく合成するための有力な手法の一つとして注目を集めている。最近開発された化学-酵素合成法の一つに、糖オキサゾリン誘導体を糖ドナーとする糖加水分解酵素による糖転移反応がある。従来、糖オキサゾリン誘導体は数ステップを要する煩雑な手法によって合成されていたが、最近、水中において一段階で合成する方法が見出された。このことにより、分岐オリゴ糖や酸性オリゴ糖のオキサゾリン誘導体化が可能になり、糖オキサゾリン誘導体を用いる糖加水分解酵素による糖転移反応は劇的な進歩を遂げた。しかしながら、糖オキサゾリンを合成する際に多くの副生物が生成することから、酵素反応に供する前の処理が大きな障壁になっている。本論文は、この問題を解決するため、2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride (DMC)による糖オキサゾリン誘導体化反応溶液中の副生成物の除去プロセス、及びオキサゾリン化反応に用いる塩基および DMC に替わる水溶性脱水縮合剤の検討を行い、さらにこれらの知見に基づいて、ヒアルロニダーゼならびに lacto-*N*-biosidase による効率的なワンポット配糖化プロセスの開発成果をまとめたものであり、全編 4 章より構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的を述べている。

第 2 章では、DMC によるヒアルロン酸 2 糖のオキサゾリン化が効率的に進行することを述べている。しかし、引き続きヒアルロニダーゼによる酵素的配糖化反応を試みたところ、オキサゾリン化反応副生成物である塩化物イオンの影響で糖転移反応効率が低下することが分かった。そこで、塩化物イオンを含有する脱水縮合剤である DMC をフッ化物イオンを有する脱水縮合剤である PDF に変更したところ、オキサゾリン化反応溶液を精製することなくヒアルロン酸糖鎖が酵素により効率的に伸長することを見出している。このように、従来法では合成困難なヒアルロン酸オリゴ糖が簡便に得られることを示している。

第 3 章では、lacto-*N*-biose から一段階で合成可能なオキサゾリン誘導体を糖ドナーとして用い、糖加水分解酵素である lacto-*N*-biosidase による糖転移反応を詳細に検討している。反応 pH、反応温度、糖ドナーと糖アクセプターの比について精査している。また、触媒として変異型酵素を使用することにより、生成物である lacto-*N*-tetraose および基質であるオキサゾリン誘導体の加水分解を抑制することができ、効率な糖転移反応が進行することを示している。さらに、低沸点塩基を用いるオキサゾリン化反応を行った後、NaOH の添加によるイオン交換により低沸点塩基を除去することにより、より高効率な糖転移反応プロセスを達成している。一方、無機塩基であるリン酸三ナトリウム(Na_3PO_4)を塩基としたオキサゾリン化反応が効率的に進行することも見出している。このことにより、塩基を反応系から除去する必要がなくなったばかりでなく、有機塩基よりも酵素に対する阻害が抑制され、その結果、糖転移反応効率が格段に向上することを示している。

第 4 章は、上記各章を総括している。

以上要するに本論文は、無保護糖を原料とし、水溶性脱水縮合剤を用いて糖オキサゾリン誘導体を合成し、糖加水分解酵素を触媒とする化学-酵素的ワンポット糖鎖合成法を開発したもので、糖鎖工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。